

Rec'd PCT/PTO 12 MAY 2005

PCT/JP03/12500

30.09.03

Handwritten signature

10'534800

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2002年11月14日

出願番号
Application Number: 特願2002-331031
[ST. 10/C]: [JP2002-331031]

REC'D 13 NOV 2003	
WIPO	PCT

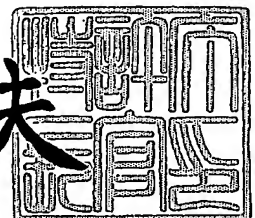
出願人
Applicant(s): 村口 篤
岸 裕幸
民谷 栄一
鈴木 正康

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年10月31日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 A25112H

【提出日】 平成14年11月14日

【あて先】 特許庁長官 殿

【発明者】

【住所又は居所】 富山県富山市明輪町 1-108-1301

【氏名】 村口 篤

【発明者】

【住所又は居所】 富山県富山市五福末広町 2556-4-3-101

【氏名】 岸 裕幸

【発明者】

【住所又は居所】 石川県金沢市平和町 3-17-14 平和宿舎 C 58
棟 13号

【氏名】 民谷 栄一

【発明者】

【住所又は居所】 富山県富山市長江本町 18-4-54

【氏名】 鈴木 正康

【特許出願人】

【住所又は居所】 富山県富山市明輪町 1-108-1301

【氏名又は名称】 村口 篤

【特許出願人】

【住所又は居所】 富山県富山市五福末広町 2556-4-3-101

【氏名又は名称】 岸 裕幸

【特許出願人】

【識別番号】 395015227

【氏名又は名称】 民谷 栄一

【特許出願人】

【識別番号】 502345407

【氏名又は名称】 鈴木 正康

【代理人】

【識別番号】 110000109

【氏名又は名称】 特許業務法人特許事務所サイクス

【代表者】 今村 正純

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 170347

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 抗原特異的リンパ球検出用マイクロウェルアレイチップ及び抗原特異的リンパ球検出法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 1 個の被検体リンパ球が含まれるマイクロウェルを複数有する抗原特異的リンパ球検出用マイクロウェルアレイチップ。

【請求項 2】 前記マイクロウェルは、直径5～100 μ mであり、深さ5～100 μ mである請求項 1 に記載のマイクロウェルアレイチップ。

【請求項 3】 前記被検体リンパ球は培養液とともにマイクロウェルに格納されている請求項 1 又は 2 に記載のマイクロウェルアレイチップ。

【請求項 4】 前記被検体リンパ球は血液由来である請求項 1 ～ 3 のいずれか1項に記載のマイクロウェルアレイチップ。

【請求項 5】 前記被検体リンパ球はBリンパ球またはTリンパ球である請求項 1 ～ 4 のいずれか1項に記載のマイクロウェルアレイチップ。

【請求項 6】 請求項 1 ～ 5 のいずれか1項に記載のマイクロウェルアレイチップの各マイクロウェルに抗原を添加し、細胞を刺激し、抗原に反応する細胞を検出することを含む、抗原特異的リンパ球の検出方法。

【請求項 7】 抗原に反応する細胞の検出を、Caイオン依存性蛍光色素を用いて行う請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】 抗原がタンパク質、ペプチド、DNA、RNA、脂質、または糖鎖である請求項 6 又は 7 に記載の方法。

【請求項 9】 抗原が、細菌、ウイルス、自己抗原、がん抗原またはアレルゲンである請求項 6 又は 7 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、抗原特異的リンパ球検出に用いるマイクロウェルアレイチップ及び抗原特異的リンパ球の検出方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

従来、抗原特異的リンパ球は図3に示すような96穴プレートを用いて、1穴あたり約200,000個のリンパ球を加えて3日から1週間、抗原の存在下で培養することにより検出していた（非特許文献1及び2）。

検出方法は

1. 細胞の増殖（ ^3H -thymidineの取り込み、生細胞の検出）

2. 抗体・サイトカインの産生

を測定することによる。

この方法では集団の中に抗原特異的リンパ球が存在することは確認できた。しかし、個々の抗原特異的リンパ球を同定することはできなかった。

【0003】

これに対して近年、蛍光色素で標識した抗原分子をリンパ球と混ぜ合わせることにより、抗原特異的リンパ球の抗原受容体に蛍光標識抗原を結合させ、蛍光標識抗原を結合したリンパ球を、フローサイトメータを用いることにより検出する方法が開発され利用されている（非特許文献3）。この方法では抗原に結合するリンパ球を同定することが可能である。さらに抗原に結合するリンパ球を分取することも可能である。

【0004】

しかしながら、上記検出方法では、分取するためにはセルソーターという高価で複雑な機器が必要である上に、以下の問題も有る。

（1）分取するための機器の条件設定が難しく、細胞を分取するためには機器操作の熟練を要する。

（2）バックグラウンドが高いため抗原特異的リンパ球の頻度が0.1%以下の場合は抗原特異的リンパ球を検出できない。

（3）細胞を分取する効率は低い。

（4）細胞を分取するのに時間がかかる。

（5）抗原が結合することは確認できるが、抗原が結合したリンパ球の反応を解析することは難しい。

【0005】

別の抗原特異的リンパ球検出法として、磁気ビーズに結合した抗原分子をリンパ球と混ぜ合わせるにより、抗原特異的リンパ球の抗原受容体に磁気ビーズ結合抗原を結合させ、磁石を用いて抗原特異的リンパ球を分取する方法も開発されている（非特許文献4）。

この方法では、複雑な装置は必要とせず、細胞の分取の時間は短時間であり、抗原が結合することも確認できる。しかし、抗原が結合したリンパ球が抗原に反応するかを解析することはできなかった。また、抗原特異的リンパ球の頻度が0.1%以下の場合は抗原特異的リンパ球を検出できなかった。

【0006】

【非特許文献1】「リンパ球機能検索法」矢野純一、藤原道夫編著、中外医学社（1994年）

【非特許文献2】「免疫実験操作法Ⅰ、Ⅱ」右田俊介、紺田進、本庶佑、濱岡利之編集、南江堂（1995年）

【非特許文献3】Altman JD, Moss PA, Goulder PJ, Barouch DH, McHeyzer-Williams MG, Bell JI, McMichael AJ, Davis MM. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes, Science, 274:94-96, 1996

【非特許文献4】Abts H, Emmerich M, Miltenyi S, Radbruch A, Tesch H, CD20 positive human B lymphocytes separated with the magnetic sorter (MACS) can be induced to proliferation and antibody secretion in vitro. Journal of Immunological Methods 125:19-28, 1989.

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

そこで本発明は、複雑な装置は必要とせず、細胞の分取の時間は短時間であり、抗原が結合することも確認でき、頻度の低い抗原特異的リンパ球(0.001%以上)も検出でき、しかも、抗原が結合したリンパ球が抗原に反応するかを解析することができる抗原特異的リンパ球検出法を提供することを目的とする。

【0008】

【課題を解決するための手段】

上記課題を解決する本発明は以下の通りである。

- (1) 1つの被検体リンパ球が含まれるマイクロウェルを複数有する抗原特異的リンパ球検出用マイクロウェルアレイチップ。
- (2) 前記マイクロウェルは、直径5～100 μ mであり、深さ5～100 μ mである(1)に記載のマイクロウェルアレイチップ。
- (3) 前記被検体リンパ球は培養液とともにマイクロウェルに格納されている(1)又は(2)に記載のマイクロウェルアレイチップ。
- (4) 前記被検体リンパ球は血液由来である(1)～(3)のいずれかに記載のマイクロウェルアレイチップ。
- (5) 前記被検体リンパ球はBリンパ球またはTリンパ球である(1)～(4)のいずれかに記載のマイクロウェルアレイチップ。
- (6) (1)～(5)のいずれか1項に記載のマイクロウェルアレイチップの各マイクロウェルに抗原を添加し、細胞を刺激し、抗原に反応する細胞を検出することを含む、抗原特異的リンパ球の検出方法。
- (7) 抗原に反応する細胞の検出を、Caイオン依存性蛍光色素を用いて行う(6)に記載の方法。
- (8) 抗原がタンパク質、ペプチド、DNA、RNA、脂質、または糖鎖である(6)又は(7)に記載の方法。
- (9) 抗原が、細菌、ウイルス、自己抗原、がん抗原またはアレルゲンである(6)又は(7)に記載の方法。

【0009】

【発明の実施の態様】

[マイクロウェルアレイチップ]

本発明のマイクロウェルアレイチップは、複数のマイクロウェルを有し、かつ各マイクロウェルが被検体リンパ球を1個含むことを特徴とする。各マイクロウェルが被検体リンパ球を1個含むことで、抗原特異的リンパ球を細胞レベルで特定することが可能になる。即ち、本発明のマイクロウェルアレイチップを用いる抗原特異的リンパ球の検出方法では、マイクロウェルに含まれる被検体リンパ球が1個であることから、抗原に反応する被検体リンパ球を1個の細胞として特定できる。

【0010】

その結果、検出された抗原特異的リンパ球を取り出して、抗原特異的抗体遺伝子やT細胞受容体遺伝子をクローニングすることが可能になる。例えば、抗原特異的抗体遺伝子がクローニングできると、それを用いて大量にヒト型モノクローナル抗体を生産することがでる。この抗体を感染症などの患者へ投与することにより、感染症などの治療、予防に用いることができると考えられる。

【0011】

但し、同一のマイクロウェルには、リンパ球以外の細胞が被検体リンパ球とともに含まれていても良い。リンパ球以外の細胞であれば、抗原に反応せず、検出されることもないからである。

【0012】

マイクロウェルの形状や寸法には特に制限はないが、マイクロウェルの形状は、例えば、円筒形であることができ、円筒形以外に、直方体、逆円錐型等であることもできる。また、円筒形のマイクロウェルの寸法は、例えば、直径5~100 μ m、好ましくは5~15 μ mであり、深さ5~100 μ m、好ましくは5~30 μ mであることができる。

1つのマイクロウェルアレイチップが有するマイクロウェルの数は、特に制限はないが、抗原特異的リンパ球の頻度が 10^5 個に1個から多い場合には約500個であるという観点から、1cm²当たり、例えば、2,000~100,000個の範囲であることができる。

【0013】

マイクロウェルには、被検体リンパ球は培養液とともに格納されている。培養液としては、例えば、以下のものを挙げることができる。

1. 137mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.8mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 1mg/mlグルコース, 1mg/ml BSA, 20mM HEPES(pH7.4)
2. 10% FCS(牛胎仔血清)含有RPMI1640培地
3. 1mg/ml BSA含有RPMI1640培地
4. 10% FCS(牛胎仔血清)含有Dulbecco's MEM培地
5. 1mg/ml BSA含有Dulbecco's MEM培地

【0014】

被検体リンパ球は血液由来であることができ、例えば、Bリンパ球またはTリンパ球であることができる。それ以外に扁桃腺(リンパ節)、脾臓等のリンパ組織由来リンパ球、がん浸潤リンパ球などの病変部位浸潤リンパ球等を挙げるができる。

【0015】

[抗原特異的リンパ球の検出方法]

本発明の抗原特異的リンパ球の検出方法は、上記本発明のマイクロウェルアレイチップの各マイクロウェルに抗原を添加し、細胞を刺激し、抗原に反応する細胞を検出することを含む。

【0016】

各マイクロウェルへの抗原の添加は、以下のように行うことができる。

1. ピペットを用いてマイクロウェルアレイチップ全面を覆うように抗原液を添加する。
2. 1ウェルずつ自動スポッターを用いて抗原液を添加する。

【0017】

本発明の抗原特異的リンパ球の検出方法により検出される抗原には、特に制限はないが、例えば、タンパク質、ペプチド、DNA、RNA、脂質、または糖鎖等であることができる。あるいは、細菌、ウイルス、自己抗原、がん抗原またはアレルゲン等であることができる。

【0018】

細胞の培養は、例えば、リンパ球を培養液に懸濁させ、マイクロウェルに分注後、室温あるいは37℃にて、空气中あるいはCO₂インキュベータ内にて培養することで行うことができる。

【0019】

抗原に反応する細胞の検出は、以下のように行うことができる。

例えば、Bリンパ球の抗原受容体(免疫グロブリン)に抗原が結合するとまず細胞内シグナル伝達が起こり、それに続いて細胞増殖、抗体産生が起こる。従って、細胞内シグナル伝達、細胞増殖、抗体産生を種々の方法により検知すること

により、抗原に反応する細胞を検出することができる。あるいは、例えば、Tリンパ球の抗原受容体に抗原が結合するとまず細胞内シグナル伝達が起こり、それに続いて細胞増殖、サイトカイン産生が起こる。従って、細胞内シグナル伝達、細胞増殖、サイトカイン産生を種々の方法により検知することにより、抗原に反応する細胞を検出することができる。

【0020】

細胞内シグナル伝達を検出することによる、抗原に反応する細胞の検出は、例えば、細胞内Caイオンの濃度変化をCaイオン依存性の蛍光色素を用いることにより行うことができる。

細胞内Caイオン濃度変化は、蛍光色素としてFura-2あるいはFluo-3を用い、検出装置として蛍光顕微鏡あるいはマイクロアレイリーダーを用いる。

【0021】

具体的には、図1に示すように、Bリンパ球にCaイオン依存性蛍光色素であるFura-2あるいはFluo-3を導入する。次いで抗原でBリンパ球を刺激すると、Bリンパ球内Caイオン濃度が上昇する。その結果、CaイオンがCaイオン依存性蛍光色素に結合し、蛍光強度が増強される。Caイオン濃度が低いと青っぽい色、高いと赤っぽい色で示されている。この方法では、抗原で刺激されることにより細胞内Caイオンが上昇したBリンパ球（抗原特異的）をマイクロウェルアレイチップを用いて検出できる。

【0022】

細胞増殖を検出することによる、抗原に反応する細胞の検出は、例えば、細胞数を、生細胞特異的蛍光色素を用いて計測することによっても行うことができる。この方法は、具体的には、抗原でBリンパ球を刺激しCO₂インキュベータ内にて37℃、3日間培養すると、細胞が増殖する。細胞が増殖後、培養液中にフルオレッセイン・ジアセテート(Fluorescein diacetate(FDA))あるいはカルボキシ・フルオレッセイン・ジアセテート・サクシニミジル・エステル(Carboxy-fluorescein diacetate, succinimidyl ester(CFSE))溶液を加える。これらの試薬は生細胞の膜を透過し、細胞内でエステラーゼによって分解され、膜不透過性の蛍光色素を生成する。この蛍光色素の発光は細胞数に比例するためウェル内の生細胞

が発光する蛍光強度の和を蛍光顕微鏡あるいはマイクロアレイリーダーを用いて計測することにより生細胞数を測定する。

【0023】

抗体産生を計測することによっても、抗原に反応する細胞の検出を行うことができる。抗体産生は抗体を免疫化学的に計測することにより検出できる。

具体的には、抗原でBリンパ球を刺激しCO₂インキュベータ内にて37℃、1週間培養すると、抗体が培養液中に分泌される。培養液中に分泌された抗原特異的抗体をELISA法(酵素標識免疫吸着法)により検出する。

あるいは、マイトゲン、レクチン、抗体、サイトカイン、PMA、Caイオノフォアを用いても、シグナル伝達、細胞増殖、抗体産生を検出することができる。

【0024】

以下に、蛍光色素を用いる方法におけるマイクロウェルアレイチップへの細胞の分注、抗原刺激、取り出しまでについて図2に基づいて説明する。

(1) 細胞の分注

マイクロウェル1つずつに細胞を入れる。

マイクロウェルに入れる細胞は、末梢血からリンパ球画分を分離後、Bリンパ球画分をさらに分離精製して得られる。

次に、Fluo3/AM(2 μ M)溶液に細胞を懸濁させ、室温に30分置き、さらに緩衝液で細胞を洗浄し、細胞内に負荷されなかった色素を除去する。

色素を除去した細胞をマイクロウェルに分注する。

マイクロウェルアレイチップの両側にシールを貼り、その上にカバーガラスを乗せ、緩衝液を満たすことで、乾燥を防ぐ。

【0025】

(2) 蛍光測定

まず、未刺激の細胞の蛍光を測定する。その際の蛍光強度(A)を測定する。

次いで抗原溶液をスライドガラスとカバーガラスの隙間に流し入れ緩衝液と交換し、抗原による刺激を受けた細胞の蛍光を測定する。刺激後1～2分後の蛍光強度(B)を測定する。刺激前後の蛍光強度比(B/A)の高いウェルの細胞を選別する。

【0026】

(3) 抗原刺激に反応した細胞の取り出し

スライドグラスとカバーグラスの隙間に空気を入れると、カバーグラスは容易に剥がれる。抗原刺激により反応した細胞を、未刺激の細胞の蛍光強度と抗原による刺激を受けた細胞の蛍光強度の比(B/A)により選別し、取り出す。

【0027】

【実施例】

以下、本発明を実施例により詳細に説明する。

実施例

1. Bリンパ球の分離

末梢血からFicoll-Paque (Pharmacia, Uppsala, Sweden) を用いてリンパ球画分を分離し、さらにAutoMACS (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) を用いてリンパ球画分からBリンパ球画分をさらに分離精製する。

【0028】

2. Fluo3の細胞への導入 (図1参照)

2×10^6 個のBリンパ球を $2 \mu\text{M}$ Fluo3/AM (同仁、熊本) /RPMI1640/10% FCS溶液に懸濁し、室温に30分インキュベーションする。RPMI1640/10% FCS溶液で細胞を洗浄し、細胞内に導入されなかったFluo3/AMを除く。その後細胞をRPMI1640/10% FCS溶液に懸濁する。

【0029】

3. マイクロウェルアレイチップ (図2参照)

マイクロウェルアレイチップはpoly(dimethylsiloxane) (PDMS) を用いて作製されており、直径 $10 \mu\text{m}$ 、深さ $32 \mu\text{m}$ のマイクロウェルが $2 \text{ cm} \times 2 \text{ cm}$ のチップ上に縦・横 $30 \mu\text{m}$ の間隔 (マイクロウェルの中心から中心までの距離は $40 \mu\text{m}$) で配置されている。マイクロウェルアレイチップの両側には厚さ 1 mm 幅約 1 mm 長さ 2 cm のシールを貼る。

【0030】

4. マイクロアレイリーダー

本装置は基本的に日立ソフトウェアエンジニアリング (株) (横浜市) のマイク

ロアレイリーダー (CRBIO IIe) を用いており、以下の変更を加えている。

1. 搭載されているレーザー (Cy3用, 532 nm; Cy5用, 635 nm) のうちの1本を 473nmのレーザーと置換してある。
2. 焦点深度も従来のものは $\pm 25 \mu\text{m}$ であるが、本装置は $\pm 50 \mu\text{m}$ に変更してある。

【0031】

5. マイクロウェルアレイチップを用いた活性化Bリンパ球の検出 (図2参照)

上記マイクロウェルアレイチップに上記細胞懸濁液を添加し、5分間静置する。マイクロウェルに入らなかった細胞をRPMI1640/10% FCS溶液を用いて洗い流す。リンパ球の直径は約 $10 \mu\text{m}$ であり、使用するマイクロウェルの直径が $10 \mu\text{m}$ であるためにひとつのマイクロウェルにはリンパ球は1個入る。カバーガラスを上記シールの上に置き、チップとカバーガラスの間にRPMI1640/10% FCS溶液を満たす。このマイクロウェルアレイチップをマイクロアレリーダーに挿入し、解像度 $10 \mu\text{m}$ でスキャンし、データを保存する (抗原刺激前の蛍光のデータ:A)。

【0032】

次に、チップとカバーガラスの間のRPMI1640/10% FCS溶液を除き、そこへRPMI 1640/10% FCS溶液に溶解させた抗原 ($10 \mu\text{g/mL}$) を加える。抗原を加えて1分後にマイクロウェルアレイチップをマイクロアレリーダーに挿入し、解像度 $10 \mu\text{m}$ でスキャンし、データを保存する (抗原刺激後の蛍光のデータ:B)。

【0033】

刺激前後の蛍光強度の比(B/A)を計算し、比の大きいウェルを特定する。このウェルの中に抗原特異的Bリンパ球が存在する。

【0034】

【発明の効果】

本発明では、血液中のリンパ球1個が1つのマイクロウェルに入るように添加し、これらのリンパ球を抗原で刺激する。ここでいう抗原とは感染症における細菌やウイルスなどの病原体をさす。血液中のリンパ球は1個1個がそれぞれ別々の抗原に反応する。本発明のマイクロウェルアレイチップを用いれば、抗原に反応するBリンパ球を検出することができる。抗原特異的Bリンパ球が検出されると、

このBリンパ球から、別のチューブあるいは同じチップを用いて、抗原（病原体）に反応する抗体遺伝子をPCRにより増幅できる。

【0035】

本発明の抗原特異的リンパ球の検出法は、マイクロウェルアレイチップを用いて行う。そのため、検出した抗原特異的リンパ球はマイクロウェルの中にあるため、その細胞の加工（細胞の分取・DNA/RNAの調製）が容易である。また、細胞の抗原に対する応答を検出できる。抗原だけでなく、様々な刺激に対する細胞の応答、また、細胞の応答に対する様々な試薬等の影響を解析することが可能である。

【図面の簡単な説明】

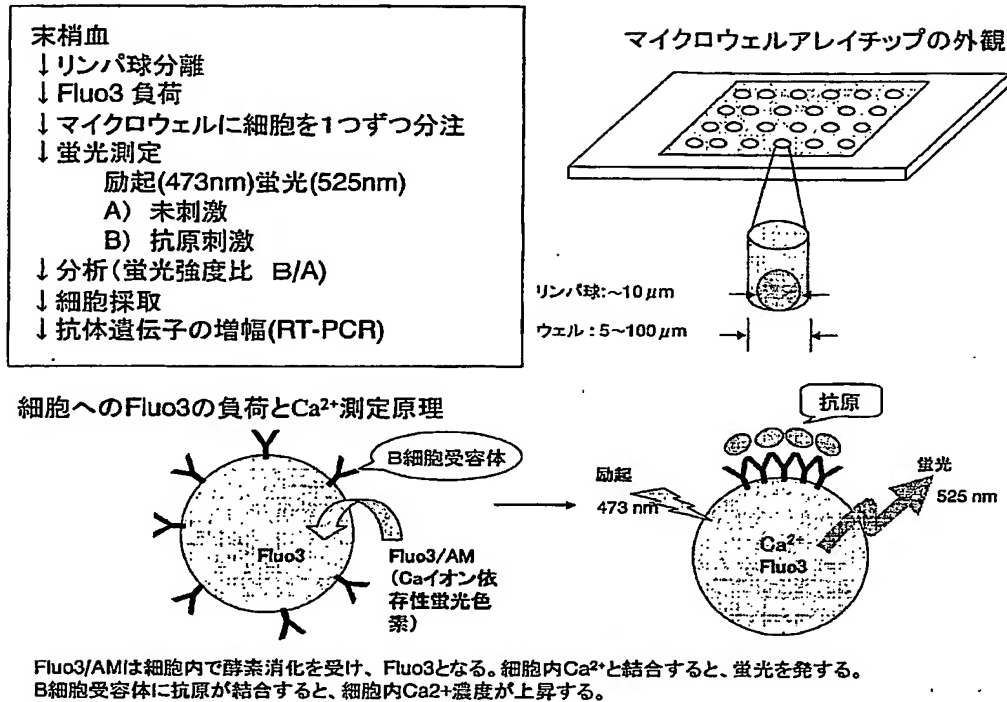
【図1】細胞内Caイオンの濃度変化をCaイオン依存性の蛍光色素を用いることにより測定する方法の説明図。

【図2】蛍光色素を用いる方法におけるマイクロウェルアレイチップへの細胞の分注、抗原刺激、取り出しまでについての説明図。

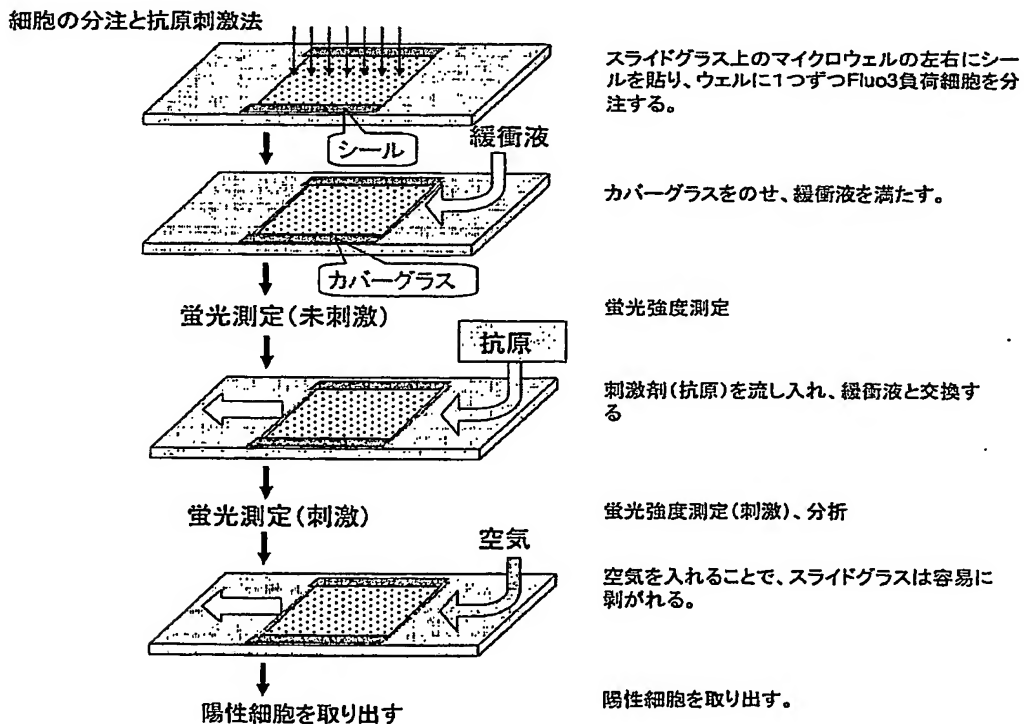
【図3】従来の抗原特異的リンパ球測定に用いられている96穴プレート。

【書類名】 図面

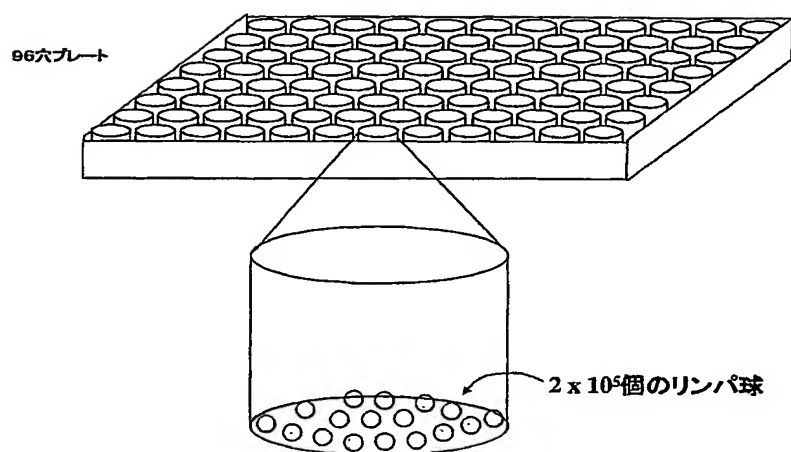
【図1】



【図2】



【図 3】



【書類名】 要約書**【要約】**

【課題】 複雑な装置は必要とせず、細胞の分取の時間は短時間であり、抗原が結合することも確認でき、頻度の低い抗原特異的リンパ球(0.001%以上)も検出でき、しかも、抗原が結合したリンパ球が抗原に反応するかを解析することができる抗原特異的リンパ球検出法を提供すること。

【解決手段】 1つの被検体リンパ球が含まれるマイクロウェルを複数有する抗原特異的リンパ球検出用マイクロウェルアレイチップ。このマイクロウェルアレイチップの各マイクロウェルに抗原を添加し、細胞を刺激し、抗原に反応する細胞を検出することを含む、抗原特異的リンパ球の検出方法。

【選択図】 図2

特願 2 0 0 2 - 3 3 1 0 3 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[3 9 5 0 1 5 2 2 7]

1. 変更年月日

2 0 0 1 年 9 月 8 日

[変更理由]

住所変更

住 所

石川県金沢市平和町 3 - 1 7 - 1 4 平和宿舍 C 5 8 棟 1 3 号

氏 名

民谷 栄一

特願 2 0 0 2 - 3 3 1 0 3 1

出 願 人 履 歷 情 報

識別番号

[5 0 2 3 4 5 4 0 7]

1. 変更年月日

2 0 0 2 年 9 月 2 4 日

[変更理由]

新規登録

住 所

富山県富山市長江本町 1 8 - 4 - 5 4

氏 名

鈴木 正康

特願 2 0 0 2 - 3 3 1 0 3 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[5 0 2 4 1 3 2 7 8]

1. 変更年月日

2 0 0 2 年 1 1 月 1 4 日

[変更理由]

新規登録

住 所

富山県富山市明輪町 1 - 1 0 8 - 1 3 0 1

氏 名

村口 篤

特願 2002-331031

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[502413289]

1. 変更年月日

2002年11月14日

[変更理由]

新規登録

住 所

富山県富山市五福末広町 2556-4-3-101

氏 名

岸 裕幸